

マウス抗ヒトc-kit 単クローン抗体の作製と性状正常及び悪性造血細胞におけるc-kit蛋白発現様式の解析

著者	森田 成
号	1252
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/21091

論 文 内 容 要 旨

M-MOK は著者の研究室で樹立されたマルチサイトカイン依存性のヒト急性巨核芽球性白血病細胞株であり、未熟骨髄芽球の性状を有している。その膜表面には未知の造血幹細胞抗原が発現している可能性を考え、それに対する単クローン抗体作製を目的とした。M-MOK を Balb/c マウスに免疫し、マウス細胞株 SP2/0 と電気融合させた。M-MOK と反応し、患者 B 細胞株と健康人末梢血白血球とは反応しない単クローン抗体を、固定細胞を用いたエライザ法によりスクリーニングした。

計 831 ウェルのマイクロカルチャーをスクリーニングしたところ、免疫原である M-MOK とは反応し、患者リンパ芽球様細胞株とは反応しない培養上清が 6 個見いだされた。うち末梢血白血球と反応しなかった 2 ウェルのハイブリドーマを、限界希釈法にて 3 度クローニングし、2 個のハイブリドーマクローン、MTK1 と MTK2 を得た。本研究では主に MTK1 を用いた実験結果を述べるが、必要に応じて MTK2 の性状にも触れる。MTK1 は骨髄単核球分画の約 3 % の細胞と反応する。CD34 が強く発現している骨髄性白血病細胞株の KG1a とは反応しない。15 株の T および B 細胞系のリンパ性白血病細胞株では全株陰性であった。13 株の骨髄性白血病細胞株中では、M7 由来細胞株 4 株の全てと M2 由来細胞株 1 株で陽性であった。M-MOK 細胞の細胞膜を精製し可溶化後、SDS-PAGE、ウェスタンブロット法にて MTK1、MTK2 の認識するエピトープの分子量を求めた。MTK1 は非還元下で、MTK2 は還元下においても、同じ 140kD と 110kD の分子を確認した。既知の膜抗原の分子量としては、c-kit のそれと一致するものであった。MTK1、MTK2 のエピトープが c-kit と一致するか否かを確認するために、ヒト c-kit 遺伝子を導入した Balb/3T3 細胞 (Balb/3T3hc-kit) を用いて、1) FITC-MTK1 あるいは FITC-MTK2 による免疫染色と 2) 非還元下で MTK1 の、また還元下で MTK2 のウェスタンブロット解析を、Balb/3T3 細胞を陰性対照として行った。MTK1、MTK2 とともに Balb/3T3hc-kit にのみ陽性結果が得られた。従って MTK1、MTK2 とともにヒト c-kit を確認する単クローン抗体であると結論された。検定に用いた細胞株の質を検討するために、M-MOK と Balb/3T3hc-kit に、c-kit mRNA が同定出来るか否かをノーザンブロット解析で検討した所、トランスフェクタントに特異的に陽性バンドが得られた。M-MOK を過剰量の MTK1 腹水あるいは MTK2 腹水でブロックした後 FITC-MTK1 で蛍光染色すると、MTK2 腹水は全く FITC-MTK1 の M-MOK への結合をブロックしない。従って c-kit 上の MTK1 と MTK2 が認識する抗原決定基は異なっている。MTK1 は SCF によって誘導される M-MOK の増殖を、50% 程度抑制する。このことから MTK1 は SCF の機能を部分的に抑制する抗体であると考えられた。それに対し、MTK2 で

は SCF 機能の抑制はみられなかった。MTK1 と二次抗体を結合させた免疫磁気ビーズを用いることにより、造血幹細胞の濃縮が可能である。方法論については今後の検討を要するが、CFU-GM でみて約 5 倍、BFU-E で見て約 50 倍の濃縮効果があった。次に新鮮あるいは凍結白血病細胞での c-kit の発現について検討した。細胞株での検討と同様に 38 症例のリンパ性白血病細胞は全例 c-kit 発現は陰性であった。一方 30 症例の骨髄性白血病細胞では、21 症例、70% で c-kit の発現が陽性、21 例中 19 例では CD34 と c-kit の共発現が見られた。今回作製した抗 c-kit 単クローン抗体 MTK1 および MTK2 は、今後正常造血幹細胞の試験管内でのマニピュレーションや、白血病の診断にその応用が期待出来る抗体と思われた。

1. ヒト c-kit を認識する単クローン抗体 MTK1 の認識するエピトープ 3 次構造は、2-ME 処理にて破壊される。このことは抗体を利用した c-kit、SCF の機能研究に新しい方法論をもたらすだろう。2. MTK2 は SCF の機能を抑制せない抗体であり、c-kit を活性化せずに c-kit 陽性細胞を濃縮純化し得る可能性がある。3. 造血幹細胞あるいは白血病細胞に発現する c-kit の機能解明に貢献し得る。

審 査 結 果 の 要 旨

造血幹細胞の効率的分離は細胞の再生や分化の研究ならびに骨髓移植や遺伝子療法などの臨床的応用の面からも重要な課題である。CD34 をマーカーとする幹細胞の純化と分取は一部ですでに臨床の現場に登場しているが、広く利用されるには未だ多くの問題が解決されなければならない。この様な背景を認識して、本研究においては造血幹細胞と関連する特異的モノクローナル抗体 (mAb) を作製し、その性状を明らかにすることを目的とした。その結果、以下の結果を得た。

1. 免疫原として CD34 陽性 MOK 細胞を用い、ヒト c-kit を認識する特異的 mAb MTK1 および MTK2 を作製した。

2. MTK1 と MTK2 は c-kit 分子の異なった抗原基を認識することをウエスタンブロット解析や細胞増殖能への影響の違いから判明した。

3. MTK1 は c-kit リガンドである SCF の細胞増殖能を抑制することから、c-kit と SCF の結合に関わる機能と競合的に作用するとした。一方、MTK2 にはこのような SCF 機能の抑制効果はない。

4. 骨髓細胞から MTK1 抗体による造血幹細胞の濃縮を試みた結果、CD34 に対する抗体と同様に、造血幹細胞を高濃度に濃縮出来ることが判明した。

5. ヒト c-kit の白血病細胞における発現様態を解析した結果、c-kit は骨髓性白血病に広く発現されており、とくに CD34 抗原との共発現が特徴的であった。これに対して、リンパ球性白血病細胞には全く c-kit の発現は認めなかった。従って、MTK1 や MTK2 は骨髓性白血病の芽球診断や骨髓性白血病とリンパ性白血病の鑑別に有用であることが示唆された。

以上の研究成果は、ヒト c-kit を認識する 2 つの mAb を作製し、両者がそれぞれ異なった抗原決定基を認識するのみならず、相違する機能を有する興味深い抗体であることを明らかにした。さらに、造血幹細胞の濃縮や白血病細胞の診断など臨床的有用性をも明らかにされた。よって、本研究論文は学位論文に価する。